

动 物 学 研 究 1998 (6): 429～433 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

电鳐β－蝮蛇毒素结合蛋白的抽提及其与毒素结合性质的研究*

王 银 徐 科 沈国光①
(中国科学院上海生理研究所 200031)
杜晓燕 周元聪
(中国科学院上海生物化学研究所 200031)

摘 要 以加州电鳐（*Torpedo californica*）电器官为材料，探索了用去垢剂 Triton X－100 增溶抽提β－蝮蛇毒素（β-agkistrodotoxin，β-AgTX）结合蛋白的合适条件，建立了此结合蛋白活性的检测方法，并分析了该结合蛋白与同位素^{125}I 标记β-AgTX 的结合性质。结果显示这种电器官中存在相对含量较高的毒素结合位点，其密度为 1 580 fmoL/mg 蛋白质，此结合作用的平衡解离常数 K_D 值为 5.5×10^{-9} mol/L。去垢剂 Triton X－100 可以有效地将该结合蛋白从电器官组织膜上增溶下来，抽提效率接近 50%，为分离、纯化此结合蛋白建立了基础。

关键词 β－蝮蛇神经毒素结合蛋白，增溶抽提，电鳐电器官
中图分类号 Q959.433

在研究神经细胞质膜上的多种离子通道和受体的结构、性质及功能时，神经毒素已成为十分有用的探针。从蛇毒分离的神经毒素分为在突触后阻断神经肌肉传递的α型毒素及在突触前抑制递质释放的β型毒素两类。β－蝮蛇神经毒素（β-agkistrodotoxin，β-AgTX）是本研究组从国产短尾蝮（*Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*）蛇毒分离纯化的一种β－蛇神经毒素（陈远聪等，1981），它是一个含 122 个氨基酸残基的单链多肽，分子量为 13.5 kDa，等电点为 6.9，分子内有 7 对二硫键，因此热稳定性很好。与其他β－蛇神经毒素一样，它也具有磷脂酶 A_2（PLA_2）的活性，也作用于神经肌肉接头，在突触前抑制神经递质释放（杨钦照等，1982）。但先前的研究表明，β-AgTX 完全不能抑制β－银环蛇毒素（β-bungarotoxin，β-BuTX）结合蛋白与其配体的结合（沈国光等，1996），这提示β-AgTX 与β-BuTX 有完全不同的作用位点。因此，β-AgTX 的结合位点可能涉及一种新的参与递质释放机制的功能蛋白质。沈国光等（1997）曾经报道了大鼠脑中存在β-AgTX 结合位点，并对其某些结合性质进行了初步探讨。我们已有证据表明，富含突触的电鳐（*Torpedo californica*）电器官组织中也存在β-AgTX 的结合位点。

本文报告以加州电鳐电器官为材料，探索增溶抽提该毒素结合蛋白的合适条件。并建立了此结合蛋白活性的检测方法，初步分析了该结合蛋白与同位素^{125}I 标记β-AgTX 的结合性质。这些工作为β-AgTX 结合蛋白的分离、纯化及进一步鉴定提供了必要的前提。

---

* 国家自然科学基金资助项目
①通信作者
本文 1997－12－29 收到，1998－05－12 修回

1 材料与方法

1.1 电鳐电器官膜增溶液的制备

取冰冻的电器官组织 5 g,在 8 mL 缓冲液 A(20 mmol/L 磷酸钠缓冲液,pH 7.4;0.1 mmol/L PMSF;0.02% NaN_3)中,用 Polytron 匀浆,匀浆液经 2 000×g 低速离心 15 min,保留上清液 S_1,沉淀 P_1 在 8 mL 缓冲液 A 中再匀浆 1 次,低速离心 15 min,弃去沉淀 P_2。合并 S_1 和 S_2,经细尼龙网过滤后,40 000×g 高速离心 1 h。沉淀 P_3 重悬于 3.7 mL 缓冲液 A 中匀浆。然后在磁力搅拌下逐滴加入以 20 mmol/L 磷酸缓冲液配制的 20%(v/v)Triton X-100,使其达到一合适浓度。去垢剂增溶抽提液的最终体积约 4 mL。在 4～8℃ 缓缓搅拌一定时间,进行增溶抽提。抽提完毕,超速离心 1 h(日立 85 P 超速离心机),转速 55 000 r/min(190 000×g)。吸取上清液 S_3,此即 β-AgTX 结合蛋白的 Triton X-100 抽提液,用于结合实验或结合活性的分析。整个实验操作除特别注明外,都在 4℃ 下或冰浴中进行。用改进的 Lowry-Folin 方法测定蛋白质浓度,以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2 β-蝮蛇神经毒素的制备

按陈远聪等(1981)报道的方法制备。

1.3 同位素^{125}I 标记 β-AgTX

采用 Hunter 和 Greenwood 的氯胺 T 法制备^{125}I-β-AgTX。反应在 pH 7.4 的磷酸钠缓冲液中进行,总体积为 235 μL,含 β-AgTX 50 μg,Na^{125}I 约 36.3 MBq,加入氯胺 T100 μg 后反应 1.5 min。以 300 μg 偏重亚硫酸钠终止反应,并加入载体 KI 10 mg。反应混合液上 Sephadex G15 柱去除游离的^{125}I 离子。^{125}I-β-AgTX 的比放射活性为 1.2×10^6～4.6×10^6 MBq/mmol 毒素蛋白。

1.4 ^{125}I-β-AgTX 与电鳐电器官膜增溶抽提液的结合

^{125}I-β-AgTX 的饱和结合实验在总体积为 200 μL 的反应混合液中进行,含电器官膜抽提液 100 μL(30 μg 蛋白质),^{125}I-β-AgTX 的浓度为 1.25～25 nmol/L。反应介质为缓冲液 B(20 mmol/L 磷酸钠缓冲液,pH 7.4;0.2% 牛血清白蛋白 BSA;5 mmol/L $CaCl_2$)。在反应混合液中加入或不加入过量的(相当于标记毒素量 100 倍以上)未标记的 β-AgTX,分别测定非特异性结合量和总结合量。在室温下反应 30 min。结合实验的检测方法采用聚乙二醇(PEG)沉淀过滤法(Cuatrecasas 等,1972)。操作如下:反应完毕,在反应液中加入 100 μL PEG 溶液,使其最终浓度为 10%,置冰浴上 12 min 后,用玻璃纤维滤膜 Whatman GF/C(直径 25 mm)抽滤,经 8% 的 PEG 溶液洗涤,用 γ 射线计数器测定滤膜的放射性计数。

1.5 未标记的 β-AgTX 对^{125}I-β-AgTX 结合的平衡抑制

未标记的 β-AgTX 对^{125}I-β-AgTX 结合的平衡抑制实验方法、条件与上述结合实验相同。反应液中仍含有 100 μL 膜抽提液,^{125}I-β-AgTX 的浓度为 64.2 nmol/L,冷毒素的浓度从 1.8×10^{-9} mol/L 增大至 9.25×10^{-7} mol/L。

1.6 实验材料与试剂

电鳐电器官购于美国 Aquatic Research Consultants 公司。同位素产品 Na^{125}I 购于英国 Amersham 公司,其放射性浓度为 3.63 GBq/mL。玻璃纤维滤膜 GF/C 为 Whatman 公司产

品。PMSF 购于 Merk 公司。PEG 为国内公司进口分装。其他试剂为国产分析纯或保证试剂。

2　结果与讨论

2.1　电鳐电器官膜蛋白增溶抽提液与^{125}I-β-AgTX 的结合

在同位素^{125}I 标记毒素与加州电鳐电器官膜抽提液的结合实验中，特异性结合量由总结合量减去非特异性结合量计算而得。图 1 是根据实验数据绘制的结合曲线和 Scatchard 图，表明这种结合是特异的和可饱和的。由此推断电鳐电器官的膜组分经去垢剂 Triton X－100 增溶后，抽提液中存在蝮蛇突触前神经毒素的结合位点。

用线性回归法进行 Scatchard 分析，推算出此结合作用的平衡解离常数 K_D 值为 5.5×10^{-9} mol/L。在这种电器官突触体膜的抽提物中，结合位点的密度甚高，为 1 580 fmol/mg 蛋白质，明显高于其他来源的组织（如大鼠脑粗突触体膜的密度仅为 57 fmol/mg 蛋白质）。这表明电鳐电器官可能是一种分离 β-AgTX 结合蛋白的好材料。而 Triton X－100 对本实验是一种有效的去垢剂，总结合活力的得率接近 50%，这就为分离、纯化该结合蛋白提供了一个良好的开端。结合实验数据的 Hill 分析（图 2）显示，结果呈明显的线性关系，其相关系数为 0.991。图 2 直线的斜率即 Hill 系数 $n_H=0.952$，接近 1，表明 β-AgTX 与其结合位点的结合过程中无协同作用。在标记毒素的实验浓度范围内（数量级为 nmol/L），电鳐电器官的结合位点在结合性质方面应是一类单一的相互间无协同作用的膜蛋白。

2.2　去垢剂 Triton X－100 的浓度及增溶抽提时间对抽提效率的影响

表 1 显示，用去垢剂 Triton X－100 增溶抽提电器官的膜蛋白，抽提液中 Triton X－100 的浓度从 0.5%增大到 2.5%，抽提液的结合活性则从 1 048 fmol 增至 1 414 fmol，抽

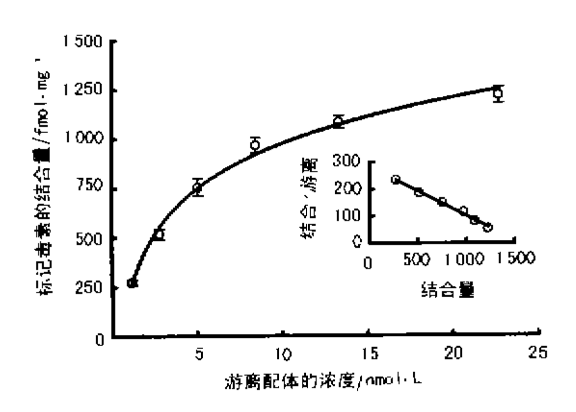


图 1　增溶的电器官蝮蛇毒素结合蛋白的饱和结合曲线

Fig. 1　Saturable binding of ^{125}I-β-AgTX to Triton X－100 extracts of electric organ membranes

插图是 Scatchard 图（inset is Scatchard plot）。

图 2　标记的蝮蛇毒素与电鳐电器官膜抽提液结合的 Hill 图

Fig. 2　Hill analysis of ^{125}I-β-AgTX binding to extracts of electric organ membranes

提效率也相应提高。这表明 Triton X－100 对本实验是一个有效的去垢剂，且其浓度大于2%可能较适宜。

用 Triton X－100 抽提电器官膜蛋白的效率也与增溶时间有关，图 3 是 3 次实验数据的汇总，横坐标表示抽提时间，纵坐标表示以抽提 3 h 的结合活性为 100%，抽提不同时间的膜抽提液结合活性与它的百分比。结果表明 3 h 左右可能是一个比较适宜的抽提时间。

表 1 去垢剂（Triton X－100）浓度对电器官膜增溶抽提效率的影响

Table 1 Effect of detergent (Triton X-100) concentration on extraction efficiency of electric organ membranes

去垢剂浓度/$v \cdot v^{-1}$	组织膜悬液总结合力/fmol	抽提液蛋白质量/mg	抽提液比结合活性/$fmol \cdot mg^{-1}$蛋白质	抽提液总结合力/fmol	抽提效率/%
0.5	2940	1.024	1023	1048	35
1.5	2940	1.120	1056	1183	40
2.5	2940	1.216	1163	1414	48

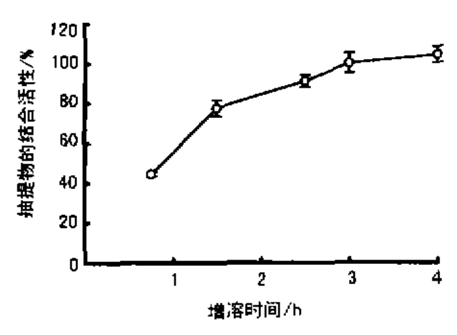


图 3 增溶时间对电鳐电器官膜抽提物结合活性的影响

Fig. 3 Effects of solubilization time on binding activities of Triton X-100 extracts of electric organ membranes

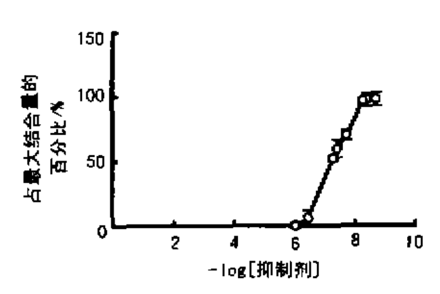


图 4 冷毒素对标记毒素结合的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of ^{125}I-β-AgTX binding to β-agkistrodotoxin-binding protein by unlabelled β-AgTX

2.3 未标记 β-AgTX 对电器官膜抽提物与^{125}I-β-AgTX 结合的平衡抑制

平衡抑制实验的结果表明，当未标记 β-AgTX 的浓度达到标记毒素的 50 倍以上时，绝大部分(97%以上)结合的标记毒素被冷毒素所取代(图 4)。当标记毒素的结合量中有 50%被取代时，冷毒素浓度 $IC_{50} = 5.5 \times 10^{-8}$ mol/L。根据公式：$K_i = IC_{50}/(1 + F/K_D)$，抑制常数 $K_i = 4.5 \times 10^{-9}$ mol/L，与标记毒素结合的平衡解离常数十分接近(5.5×10^{-9} mol/L)，表明同位素标记对毒素的结合亲和力没有显著影响。

人们对神经突触后传递机制的认识较超前，而对突触前过程的了解却相对滞后，原因之一是缺乏合适的探针。我们希望 β-AgTX 结合蛋白的鉴定、分离和纯化将推进该领域的工作，而这正是我们下一步的目标。

参 考 文 献

陈远聪，武祥福，张景康等，1981．蝮蛇突触前毒素的纯化及其生化性质的进一步研究．生物化学与生物物理学报，13（2）：205～212．

沈国光，卓晓亮，张新妹等，1996 增溶抽提β-银环蛇神经毒素结合蛋白及某些突触前毒素对其结合的抑制作用．生理学报，48（1）：94～97．

沈国光，张新妹，徐 科，1997．大鼠脑中存在β-蝮蛇神经毒素的结合位点．科学通报，42（18）：1997～2000．

杨钦照，徐 科，1982 蝮蛇神经毒素对神经肌肉传递的突触前作用．中国药理学报，3（4）：221～223．

Cuatrecasas P, 1972. Isolation of the insulin receptor of liver and fat-cell membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69** (2): 318－322.

SOLUBILIZATION OF β-AGKISTRODOTOXIN-BINDING PROTEIN FROM *Torpedo* ELECTRIC ORGAN AND STUDIES ON ITS BINDING PROPERTIES WITH THE TOXIN

WANG Yin XU Ke SHEN Guo-guang

(*Shanghai Institute of Physiology, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031)

DU Xiao-yan ZHOU Yuan-cong

(*Shanghai Institute of Biochemistry, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031)

Abstract

It was infered that β-agkistrodotoxin-binding protein is presumably a novel presynaptic functional protein involved in neurotransmitter release. This paper reported studies on solubilization of β-agkistrodotoxin-binding protein from *Torpedo californica* electric organ, a tissue rich in synapses. The binding assay of this protein was established using a PEG precipitation method, and its binding properties with ^{125}I-labelled β-AgTX was preliminarily determined. The results showed that the density of β-AgTX-binding sites in this tissue is relatively high (much higher than that of rat brain). B_{max} is 1 580 fmol/mg protein and K_D value is 5.5×10^{-9} mol/L. Triton X-100 was proved an effective detergent for the extraction experiment with a yield of about 50%. Thus a hopeful beginning for isolation and purification of β-agkistrodotoxin-binding protein was accomplished.

Key words β-AgTX-binding protein, Solubilization, *Torpedo* electric organ